

47. 59-219270, Dec. 10, 1984, METHOD AND REAGENT FOR STABILIZATION OF

TETRAZOLIUM SALT WITH CYCLODEXTRIN, KAZUHIKO YAMAMOTO, et al., CO/D 257\*04,  
CO/D 417\*04; CI2Q 1\*26; GOIN 31\*22; GOIN 33\*50

59-219270

L2: 47 of 49

# ABSTRACT:

PURPOSE: To prevent the loss of stability of a tetrazolium salt caused by thiol compound, etc., and to enable the use of the salt widely as a reagent for the accurate colorimetry of a reducible substance, by using beta- and/or gamma- cyclodextrin as active component.

CONSTITUTION: The tetrazolium salt having the partial structure of formula 1, e.g. the compound of formula II (R.sup.1, R.sup.2 and R.sup.3 are organic residue) open bracket preferably the compound of formula II (X.sup.1 and X.sup.2 are NO.sub.2 or H; X.sup.3 is OCH.sub.3, -1 OH), etc. close bracket, is stabilized by using a component containing beta- cyclodextrin and/or gamma- cyclodextrin as active component. The preferable

59-219270

L2: 47 of 49

concentration of the above stabilizing component is usually 0.1 approx. 0.5W/V% for beta- cyclodextrin and 0.1 approx. 2W/V% for gamma- cyclodextrin. Although the tetrazolium compound is reduced by the reduction of the tetrazolium salt, has high dyeability to stain, etc., however, the dyeing can be effectively prevented by the use of operation

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和59年(1984)12月10日

C 07 D 257/04

7132-4C

417/04

7431-4C

C 12 Q 1/26

8213-4B

G 01 N 31/22

7621-2G

33/50

E 8305-2G

発明の数 2

審査請求 未請求

(全 16 頁)

⑭ シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩  
の安定化方法及び安定化用試薬

東京都板橋区赤塚3丁目17番10号

⑯ 発明者 花田寿郎

川越市大字南大塚784

⑰ 特 願 昭58-95185

⑱ 出 願 昭58(1983)5月30日

⑲ 出 願 人 和光純薬工業株式会社

大阪市東区道修町3丁目10番地

⑳ 発 明 者 山西一彦

明 細 書

1. 発明の名称

シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の  
安定化方法及び安定化用試薬

2. 特許請求の範囲

(1)  $\alpha$ -シクロデキストリン又は $\gamma$ -シクロデキストリンを有効成分として用いる、部分構造

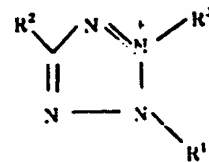


を有するテトラゾリウム塩の安定化方法。

(2) 部分構造



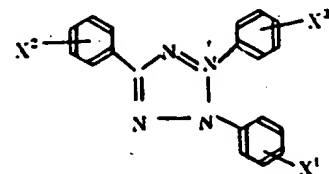
を有するテトラゾリウム塩が、一般式(1)で示されるモノテトラゾリウム塩である、特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。



(1)

(但し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は有機残基を表わす。)

(3) 一般式(1)で示されるモノテトラゾリウム塩が、一般式(2)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第2項記載の安定化方法。

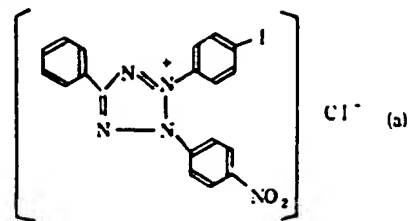


(2)

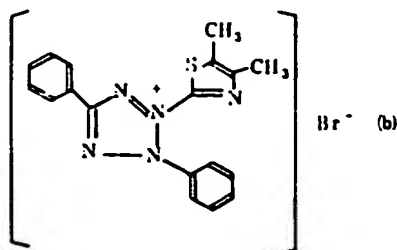
(但し、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、-NO<sub>2</sub>又は-Clを表わし、X<sup>3</sup>は、-OCH<sub>3</sub>、-I又は-Brを表わす)

(4) 一般式(2)で示されるモノテトラゾリウム塩が構造式(2)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第3項記載の安定化方法。

ム塩である特許請求の範囲第3項記載の安定化方法。



(5) 一般式(1)で示されるモノテトラゾリウム塩が、構造式(b)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第2項記載の安定化方法。

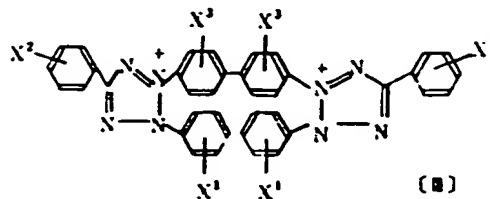


(6) 部分構造



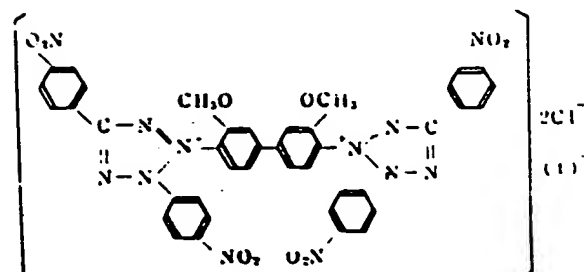
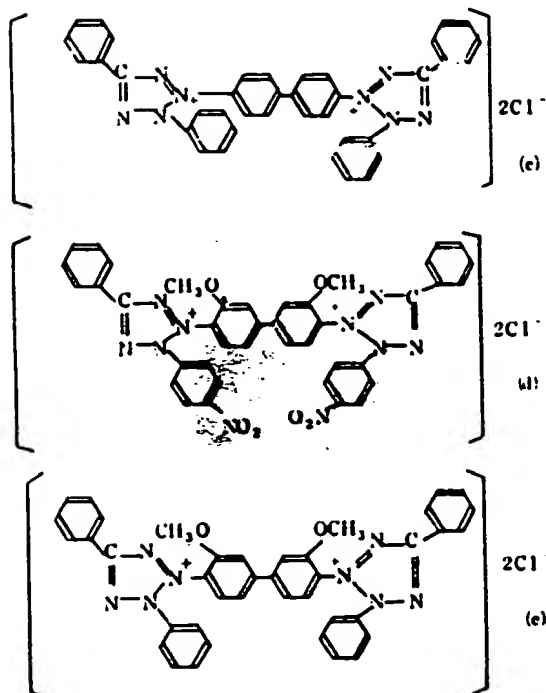
含有するテト

ラゾリウム塩が、一般式(1)で示されるジテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。



(但し、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、-NO<sub>2</sub>又は-Hを表わし、X<sup>3</sup>は-OCH<sub>3</sub>、-I又は-Hを表わす。)

(7) 一般式(1)で示されるジテトラゾリウム塩が、構造式(c)乃至(f)で示されるジテトラゾリウム塩の1である特許請求の範囲第6項記載の安定化方法。



(8) 溶液中にドーシクロデkastリン又はドーシクロデkastリンを存在させる、特許請求の範囲第1項、第2項、第3項、第4項、第5項、第6項、又は第7項記載の安定化方法。

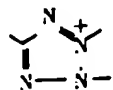
(9) 溶液中のドーシクロデkastリンの濃度が0.01~1.5重量/容量%である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(10) 溶液中のドーシクロデkastリンの濃度が0.01~10重量/容量%である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(11) 溶液中のドーシクロデkastリン及びドーシクロデkastリンの濃度が、ドーシクロデkastリン0.01~1.5重量/容量%、ドーシ

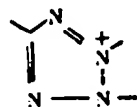
クロデキストリン0.01~10重量/容量%の範囲で任意の比率に混合した濃度である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(12) 析液がナオール化合物及び部分構造



を有するナトラゾリウム塩及び $\beta$ -シクロデキストリン又は $\alpha$ -シクロデキストリンを含有して成る、安定化されたナトラゾリウム塩溶液である、特許請求の範囲第8項、第9項、第10項又は第11項記載の安定化方法。

(13) ナオール化合物及び部分構造



を有するナトラゾリウム塩及び $\beta$ -シクロデキストリン又は $\alpha$ -シクロデキストリンを含有して成る、安定化されたナトラゾリウム塩溶液が、基質に作用してスーパーオキシド

は酸化酵素である、特許請求の範囲第13項又は第14項記載の安定化方法。

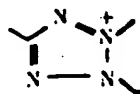
(17) 基質又は酸化酵素が体液成分である、特許請求の範囲第16項記載の安定化方法。

(18)  $\beta$ -シクロデキストリン又は $\alpha$ -シクロデキストリンを有効成分として含有する部分構造

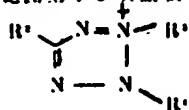


を有するナトラゾリウム塩の安定化用試薬。

(19) 部分構造



を有するナトラゾリウム塩が、一般式(1)で示されるモノナトラゾリウム塩である、特許請求の範囲第18項記載の安定化用試薬。



(1)

イオンを生成させる酸化酵素を含有する特許請求の範囲第12項記載の安定化方法。

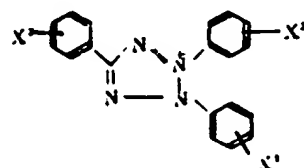
(14) グルコース、コレステロール、グリセロール、グリセロール燐酸エステル、コリン、アシルCoA、ビルビン酸、尿酸、キサンテン又は乳酸を基質とし、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール燐酸エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンテンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼである、特許請求の範囲第13項記載の安定化方法。

(15) ナオール化合物が、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、メルカプトエタノール、チオサリチル酸、システアミン、システイン、ジメルカプトコヘク酸である特許請求の範囲第12項又は第13項記載の安定化方法。

(16) 基質又は酸化酵素が血液試料中の基質又は

(但し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は有機残基を表わす。)

(20) 一般式(1)で示されるモノナトラゾリウム塩が、一般式(2)で示されるモノナトラゾリウム塩である特許請求の範囲第19項記載の安定化用試薬

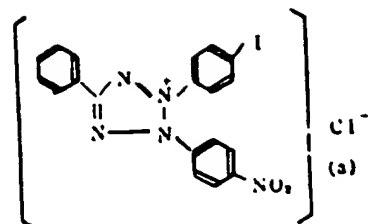


(2)

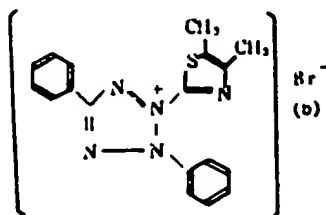
(但し、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、-NO<sub>2</sub>又は-Hを表わし、X<sup>3</sup>は、-OCH<sub>3</sub>、-F又は-Hを表わす。)

(21) 一般式(1)で示されるモノナトラゾリウム塩が構造式(2)で示されるモノナトラゾリウム塩である特許請求の範囲第20項記載の安定化用試薬。

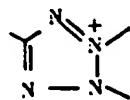
次の記号第18項記載の安定化用試薬。



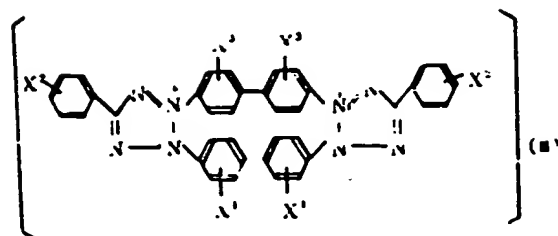
(22) 一般式(1)で示されるモノテトラゾリウム塩が、構造式(1)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第19項記載の安定化用試薬。



(23) 部分構造

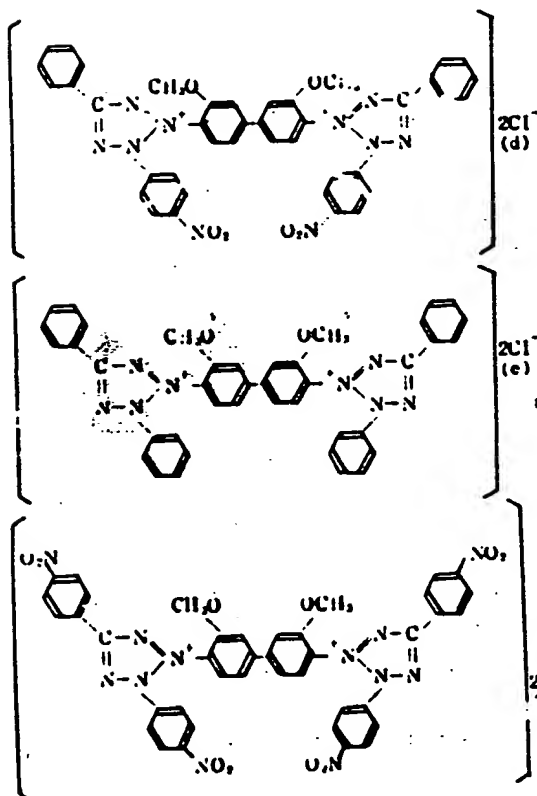
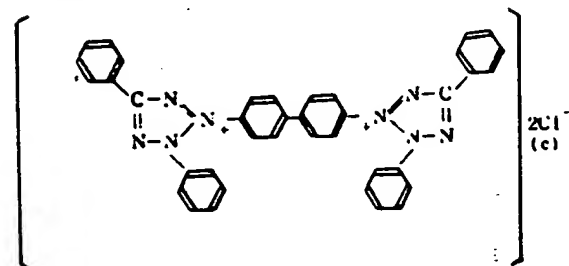


を有するテトラゾリウム塩が、一般式(2)で示されるジテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第23項記載の安定化用試薬。



(但しX¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は-OC(=O)-、-I又は-Hを表わす。)

(24) 一般式(2)で示されるジテトラゾリウム塩が、構造式(c)乃至(f)で示されるジテトラゾリウム塩の1である特許請求の範囲第23項記載の安定化用試薬。



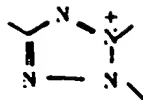
(25) 溶液中に $\mu$ -シクロデキストリン又は $\gamma$ -シクロデキストリンを存在させる、特許請求の範囲第18項、第19項、第20項、第21項、第22項、第23項、又は第24項記載の安定化用試薬。

(26) 溶液中の $\mu$ -シクロデキストリンの濃度が0.01~1.5重量/容量%である特許請求の範囲第25項記載の安定化用試薬。

(27) 溶液中の $\gamma$ -シクロデキストリンの濃度が0.01~10重量/容量%である特許請求の範囲第25項記載の安定化用試薬。

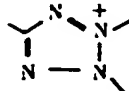
(28) 溶液中の $\mu$ -シクロデキストリン及び $\gamma$ -シクロデキストリンの濃度が、 $\mu$ -シクロデキストリン0.01~1.5重量/容量%、 $\gamma$ -シクロデキストリン0.01~10重量/容量%の範囲で任意の比率に混合した濃度である特許請求の範囲第25項記載の安定化用試薬。

(29) 溶液が、チオール化合物及び部分構造



を有するテトラゾリウム塩及び $\beta$ -シクロデキストリン又は $\alpha$ -シクロデキストリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液である、特許請求の範囲第25項、第26項、第27項又は第28項記載の安定化用試薬。

(30) ナオール化合物及び部分構造



を有するテトラゾリウム塩及び $\beta$ -シクロデキストリン又は $\alpha$ -シクロデキストリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液が、基質に作用してスーパーオキシドイオンを生成させる酸化酵素を含有する特許請求の範囲第29項記載の安定化用試薬。

(31) グルコース、コレステロール、グリセロ

ール、グリセロール脂肪酸エステル、コリン、アシルCoA、ビルビン酸、尿酸、キサンテン又は乳酸を基質とし、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール脂肪酸エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンテンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼである特許請求の範囲第30項記載の安定化用試薬。

(32) ナオール化合物が、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、メルカプトエタノール、チオサリチル酸、システアミン、システイン、ジメルカプトコハク酸である特許請求の範囲第30項又は第31項記載の安定化用試薬。

(33) 基質又は酸化酵素が被検試料中の基質又は酸化酵素である、特許請求の範囲第30項又は第31項記載の安定化用試薬。

(34) 基質又は酸化酵素が体液成分である、特

許請求の範囲第33項記載の安定化用試薬。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は、シクロデキストリンを有効成分とする、テトラゾリウム塩の安定化方法及び安定化用試薬に関するものである。

ニトロテトラゾリウムブルー（以下NO<sub>2</sub>-TBと略記する。）等のテトラゾリウム塩類は一般に酸化還元電位が低く、還元されるとモノホルマジン化合物又はジホルマジン化合物のようなホルマジン化合物を生じ褐色～青色を呈するので、臨床化学、薬学、生化学、食品化学のような分野に於て、脱水素酵素の測定用試薬として或は還元性物質の比色定量用試薬として広く用いられている。

しかしながら、テトラゾリウム塩類の水溶液は一般に安定ではあるが、ナオール化合物等の還元性物質が存在すると次第に分解し、これに褐色を生じる為、試薬百換値の経時的上昇をきたし、誤

差の原因となる。

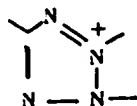
テトラゾリウム塩を用いて、被検試料中の体液成分の測定例を挙げると、スーパーオキシドイオンO<sub>2</sub><sup>-</sup>を定量的に生成する反応で生成したスーパーオキシドイオンにより定量的にテトラゾリウム塩類が還元されて生成するホルマジン化合物の量色を定量する方法及び試薬がある。

このようなスーパーオキシドイオンの生成反応の例として、酸化酵素を基質に作用させ、スーパーオキシドイオンを生成させる酵素反応があるが、これは具体的実施に当り、好ましくは、ナオール化合物、アルコール、フェノール化合物の共存下で、酸化酵素を基質に作用させ、スーパーオキシドイオンを生成させる酵素反応により、目的成分を定量するものである。このスーパーオキシドイオンをテトラゾリウム塩と定量的に反応させて、テトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマジン化合物の量色を定量的に測定する場合は、ナオール化合物の存在により、それらテトラゾリウム塩が不安定となり、ナオール化

化合物及びテトラゾリウム塩を含有する溶液が着色して、目的成分の定量的測定を妨害する問題点が生じる。

本発明者らは、上記問題点を解決すべく鋭意研究の結果、テトラゾリウム塩類を含有する溶液に、特定のシクロデkastリン、即ち、 $\beta$ -シクロデkastリン又は $\gamma$ -シクロデkastリンを共存させることにより、テトラゾリウム塩が安定化されることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、 $\beta$ -シクロデkastリン又は $\gamma$ -シクロデkastリンを有効成分として用いる部分構造



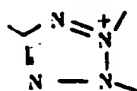
を有するテトラゾリウム塩の安定化方法及び試薬である。

$\alpha$ -シクロデkastリンにはそのような作用、効果はなく、 $\beta$ -シクロデkastリン又は $\gamma$ -シクロデkastリンにのみ、そのような作用、効果

ン化合物が吸光度測定用の被染体であるセルなどに染色して誤差を生じるなどの欠点を有する。

この問題は、セラチンを有効成分として用いることにより解決された。即ち、セラチンは、テトラゾリウム塩から生成するホルマジン化合物の染色力を効果的に抑制し、同テトラゾリウム塩が還元されて生成する色素であるホルマジン化合物による被染体の染色を効果的に防止する効果を行うため、テトラゾリウム塩を含有する溶液にセラチンを存在させると、そのような染色は効果的に防止される。

本発明は、 $\beta$ -シクロデkastリン又は $\gamma$ -シクロデkastリンによって、部分構造



を有するテトラゾリウム塩を安定化させる以外、<sup>Xは</sup>そのようなテトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマジン化合物による染色をセラチンを有効成分として用いて効果的に防止する以外は、

が認められる。

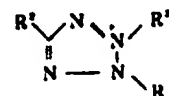
これは、一般的には、それら $\beta$ -シクロデkastリン又は $\gamma$ -シクロデkastリンによるテトラゾリウム塩の包接作用によるものであると考えることができる。このようにして $\beta$ -シクロデkastリン又は $\gamma$ -シクロデkastリンによって安定化されたテトラゾリウム塩であっても、スーパーオキシダイオンによるテトラゾリウム塩の還元反応は、充分速い反応速度で進行し、還元反応で生成したホルマジンの呈色を測定することにより、充分な感度でスーパーオキシダイオンを定量的に測定することができる。従って、 $\beta$ -シクロデkastリン又は $\gamma$ -シクロデkastリンを添加しない場合と発色率の変化はなく、しかも、消光値の上昇は抑制される。

又、本発明に関して用いるテトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマジン化合物は、ガラス材質、プラスチック材質などの被染体に強い染色性を有し、ホルマジン化合物による被染体の染色現象を惹起し、結果として、そのようなホルマジン

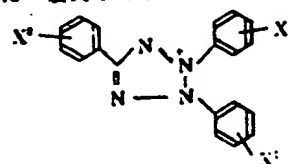
自体公知の方法及び試薬によっても容易に実験をすることができ。

部分構造 を有するテトラゾ

リウム塩の典型の1は、有機炭基 $R^1$ 、 $R^2$ 、及び $R^3$ をその置換基として有する、一般式(1)

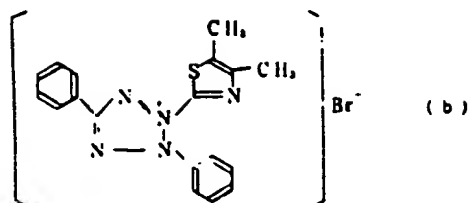


で示されるモノテトラゾリウム塩であり、そのようなモノホルマジン化合物(1)として代表的なものに一般式(2)

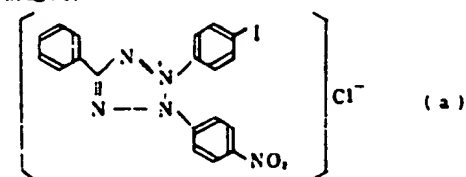


(但し $X^1$ 及び $X^2$ は、 $-\text{NO}_2$ 又は $-\text{H}$ を表わし、 $X^3$ は、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{I}$ 又は $-\text{H}$ を表わす。)で示さ

れるモノテトラゾリウム塩や構造式(b)

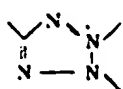


で示されるモノテトラゾリウム塩があり、一般に  
(II)で示されるモノテトラゾリウム塩の一例として構造式(a)

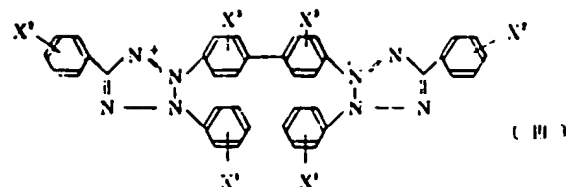
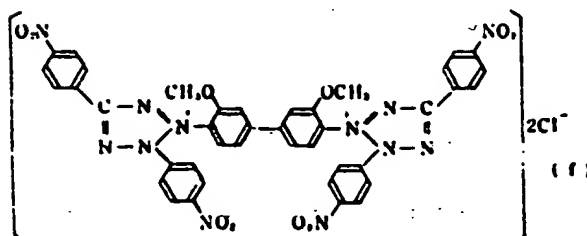
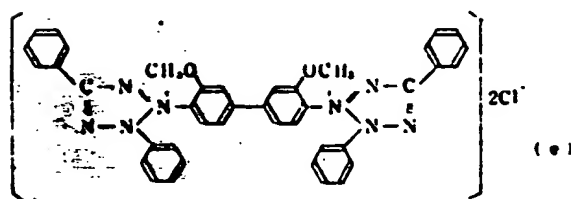
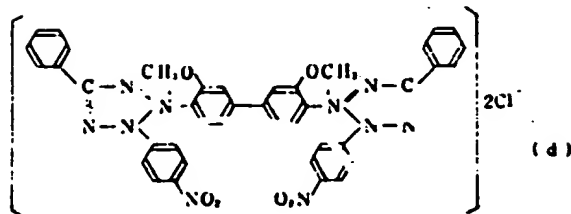


で示されるモノテトラゾリウム塩がある。

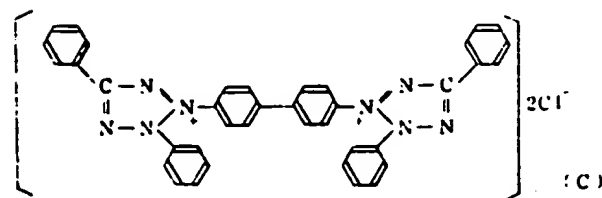
又、部分構造



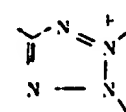
を有するテトラゾリウム塩の他の典型のIは一般式(III)



(但しX'及びX'は、-NO<sub>2</sub>又は-Hを表わし、X'は、-OCH<sub>3</sub>、-I又は-Hを表わす。)で示されるジテトラゾリウム塩であり、そのような一般式(III)で示されるジテトラゾリウム塩の例として構造式(c)乃至(f)で示されるジテトラゾリウム塩がある。



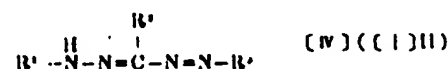
又、部分構造



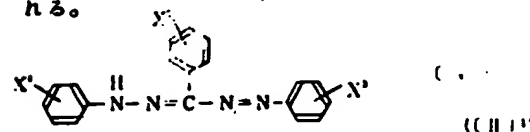
を有するテ

テトラゾリウム塩が還元されて生成する部分構造

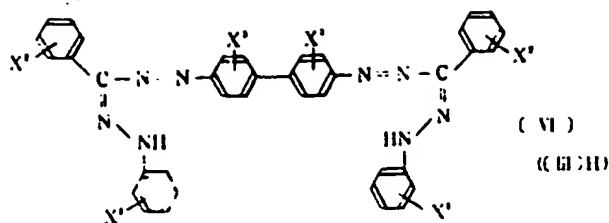
-N=N=C-N=N-を有するホルマジン化合物であって一般式(I)で示されるモノテトラゾリウム塩から生成するモノホルマジン化合物は、一般式(IV)((I)II)で示される。



又、一般式(III)で示されるモノテトラゾリウム塩又は一般式(II)で示されるジテトラゾリウム塩から生成するホルマジン化合物は、各々一般式(V)((III)II)、一般式(VI)((II)II)で示される。

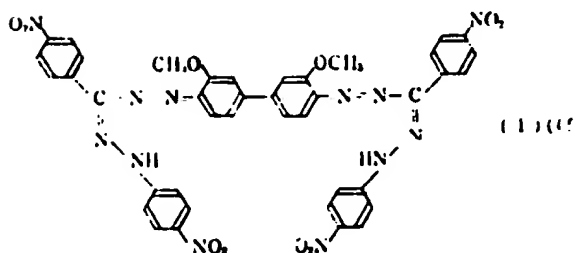
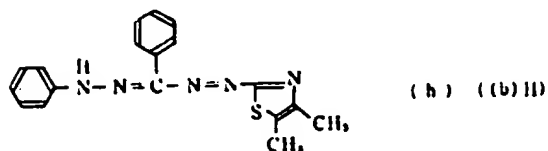
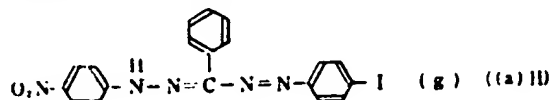




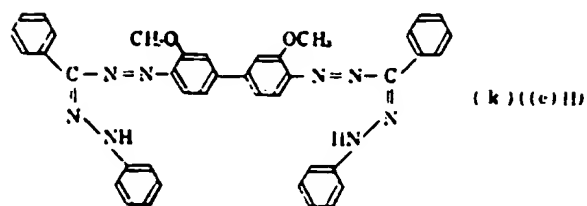
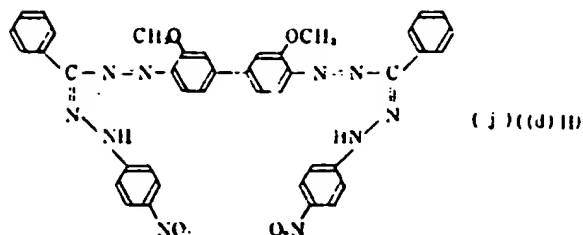
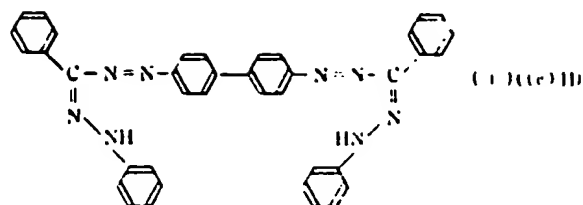


(但し、 $X^1$  及び  $X^2$  は、 $-\text{NO}_2$  又は  $-\text{H}$  を表わし、 $X^3$  は、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{I}$  又は  $-\text{H}$  を表わす。)

又、構造式(a)乃至(f)で示されるテトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマジン化合物は、構造式(g) (a)(II) 乃至(i) (f)(II) で示される。



テトラゾリウム塩を安定化する $\beta$ -ナフトクロヂヤストリン又は $\alpha$ -ナフトクロヂヤストリンの濃度について述べると、溶液中、 $\beta$ -ナフトクロヂヤストリンを用いる濃度の一例としては、溶液中、通常、0.01~1.5重量/容量%、 $\alpha$ -ナフトクロヂヤストリンを用いる濃度の一例としては、同じく、溶液中、通常、0.01~1.0重量/容量%であり好ましい一例としては、通常、 $\beta$ -ナフトクロヂヤストリンは0.1~0.5重量/容量%、 $\alpha$ -ナフトクロヂヤストリンは0.1~3重量/容量%が用いられる。又、 $\beta$ -ナフトクロヂヤストリンと $\alpha$ -ナフトクロヂヤストリンを上記濃度で任意の比率で混合して用いてもよい。



本発明に於て特に効果的なゼラチンは、その平均分子量が20000~150000であるようなゼラチンであって、その分子量が例えば1000とか2000であるような水溶性ゼラチンについてはそのような効果は特に効果的ではないように見える。しかしながら、本発明に係るゼラチンは、その平均分子量が20000~150000であるようなゼラチンに限定されるものではなく、これら、その平均分子量が20000~150000であるようなゼラチンと同等な作用を有するものであれば、いずれのものでよい。なお、その由来は、動物の骨や皮などに由来するものが市販されているが、これらに限られるものではない。溶液中で効果的なゼラチン濃度は、通常、一例、0.1~0.7重量/容量%、好しくは、一例、0.2~0.5重量/容量%である。

又、希質に作用してスーパーオキサイドイオンを生成させる酸化酵素による触媒反応の一例としては、希質がグルコース、コレステロール、グリセロール、グリセロール磷酸エステル、コリン、アシルCoA、ピルビン酸、尿酸、トランスフェ

又は乳酸であり、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール過酸エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、フラノトンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼ等が挙げられる。このとき、共存させるチオール化合物の一例として、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、メルカプトニタノール、チオサリチル酸、システアミン、システイン又はジメルカプトコハク酸が挙げられる。

本発明は、 $\beta$ -シクロデキストリン又は $\gamma$ -シクロデキストリンを有効成分として用いることにより、テトラゾリウム塩を安定化する方法及び試薬を提供するものであり、特に、基質に酸化酵素を作用させてスーパーオキシドイオン $O_2^{\cdot-}$ を生成させる反応の具体的実施に当り存在させるチオール化合物によるテトラゾリウム塩の不安定化の現象を効果的に防止する技術を提供するものであ

て、その結果、そのような反応を適用して試料中の目的成分（例えば、検出成分）を定量する測定の実験的検値の上昇を効果的に抑制するなどを含めて、一般に、テトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマジン化合物の呈色を測定する測定法及び試薬の臨床診断薬、製薬、化学、生化学、食品化学の分野に於る適用を極めて容易ならしめる点に於て顕著に貢献する所、極めて大なるものがある。

以下に本発明に係る実施例を述べるがこれに限定されるものではない。

#### 実施例1 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：各々、 $NO_2-TB$ が20mg/ml、フェノールが0.01%、トリトンX-100が0.1%、パーオキシダーゼ（東洋紡製）が300u/ml、コレステロールオキシダーゼ（天野製薬製）が15u/ml、グルタチオン（還元型）が20mg/ml、ゼラチンが0.5%、 $\beta$ -シクロデキストリンが0.2%の濃度になるように、0.1Mトリス緩衝液（pH8.0）にこれらを溶解した液を発色試液とする。

血清遊離コレステロールの測定：血清50 $\mu$ lをとり、これに発色試液3mlを加えて、37℃恒温槽中10分間加温後水を対照として波長560nmにおける吸光度を測定する。別に、血清の代りにイオン交換水を用いて同様に操作して求めた吸光度を試薬自検値とする。

血清の代りに、コレステロールの200mg/mlなるイソプロパノール溶液（標準液）を用いて同様に操作して標準の吸光度を求める。次式により血清中の遊離コレステロール濃度を算出する。

$$\frac{E_s - E_b}{E_{std} - E_b} \times 200 \text{ mg/ml}$$

$E_s$ ：血清を用いたときの吸光度

$E_b$ ：試薬自検値

$E_{std}$ ：標準液を用いたときの吸光度

#### 比較例1 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例1の発色試液からゼラチンと $\beta$ -シクロデキストリンを除いた発色試液を調製

する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1に同じ。

#### 実施例1と比較例1の測定結果比較表

比較表 1

試 料	実施例1 (mg/ml)	比較例1 (mg/ml)
血清		
1	44.3	43.9
2	32.5	32.8
3	66.8	66.5
4	14.0	44.0
5	59.9	59.5
6	48.9	49.0
7	5.5	36.0
8	10.2	10.0
9	39.3	39.4
10	47.7	47.4
平均	45.90	45.85

比較表 2

試薬前検値の比較

項 目 \ 例	実施例 1	比較例 1
560nmの吸光度 (水対照)	0.076	0.183

比較表 3

コレステロール標準液呈色度の比較

項 目 \ 例	実施例 1	比較例 1
560nmの吸光度 (Std-Es)	1.267	1.271

比較表 4

室温保存に於ける発色試液の経時変化

保 存 時 間 \ 例	実施例 1	比較例 1
0 時間	澄 明	澄 明
1 8 時間	澄 明	濁り及び少量の沈殿
1 8 時間	澄 明	濁り及び大量の沈殿
7 2 時間	澄 明	濁り及び大量の沈殿

実施例 1 と実施例 2 の測定結果比較表

比較表 1

試薬前検値の比較

項 目 \ 例	実施例 1	実施例 2
560nmの吸光度 (水対照)	0.076	0.081

比較表 2

室温保存に於ける発色試液の経時変化

保 存 時 間 \ 例	実施例 1	実施例 2
0 時間	澄 明	澄 明
1 8 時間	澄 明	澄 明
1 8 時間	澄 明	澄 明
7 2 時間	澄 明	澄 明

比較表 5

ガラスセルに対する染色性

項 目 \ 例	実施例 1	比較例 1
結 果	染色無し	セル全体が淡紫色に染色

コレステロール標準液の呈色液をガラスセルに入れ 18 時間室温に放置後液を捨てて水洗し乾燥して染色度を測定した。

比較表 1, 2, 3, 1.5 から明らかなように、ゼラチンも、 $\beta$ -マンノシドキシトリンも、酵素法によるコレステロールの定量には全く影響を与えず、これらは、試薬前検値の上昇を効果的に抑制し、かつ発色試液を安定化し及び、呈色液によるガラスセルの染色を効果的に防止する。

実施例 2 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例 1 の発色試液からゼラチンを除いた発色試液を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例 1 に同じ。

比較表 3

ガラスセルに対する染色性

項 目 \ 例	実施例 1	実施例 2
結 果	染色無し	セル全体が淡紫色に染色

比較表 1, 2, 3 から明らかなように、 $\beta$ -マンノシドキシトリンは試薬前検値の上昇を効果的に抑制し、かつ発色試液の安定化の効果をもたらすが、ガラスセルの染色を防止する効果は無い。

参考例 1 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例 1 の発色試液から  $\beta$ -マンノシドキシトリンを除いた発色試液を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例 1 に同じ。

実施例 2 と参考例 1 の測定結果比較表

比較表 1

試薬前検値の比較

項 目 \ 例	実施例2	参考例1
560nmの吸光度(水参照)	0.081	0.209

比較例 2

ガラスセルに対する染色性

項 目 \ 例	実施例2	参考例1
結 果	セル全体が淡紫色に染色。	染色無し。

比較表1,2から明らかなようにセラチンには試薬吸光度の上昇抑制効果は無いが、ガラスセルに対する染色防止効果がある。

実施例3 血清遊離コレステロールの測定

実施例1の発色試薬の調製法に従い、 $\beta$ -シクロデキストリンの代わりに $\alpha$ -シクロデキストリンを用い、これを0.3%の濃度で調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1に同じ。

比較例2 血清遊離コレステロールの測定

発色試薬 実施例3の発色試薬からセラチンと $\alpha$ -シクロデキストリンを除いた発色試薬を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1に同じ。

実施例3と比較例2の測定結果比較表

比較表 1

項 目 \ 例	実施例3	比較例2
1	52.7	53.0
2	48.1	48.0
平 均	50.4	50.5

比較表 2

試薬吸光度の比較

項 目 \ 例	実施例3	比較例2
560nmの吸光度	0.071	0.190

比較表 3

コレステロール標準液吸光度の比較

項 目 \ 例	実施例3	比較例2
(Std-Es) 560nmの吸光度	1.270	1.268

比較表 4

室温保存に於ける発色試薬の経時変化

保存時間 \ 例	実施例3	比較例2
0時間	澄 明	澄 明
18時間	澄 明	濁り及び少量の沈殿
18時間	澄 明	濁り及び大量の沈殿
72時間	澄 明	濁り及び大量の沈殿

比較表 5

ガラスセルに対する染色性

項 目 \ 例	実施例3	比較例2
結 果	染色無し	セル全体が淡紫色に染色

実験法は実施例1に同じ。

# 手続補正書

昭和59年 8月27日

特許庁長官 殿



## 1. 事件の表示

昭和58年特許願第95185号

## 2. 発明の名称

シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 541

住所 大阪府大阪市東区船場3丁目10番地  
電話 TEL 03-270-6171

名称 和光純薬工業株式会社  
代表者 二 力 二 生

## 4. 補正命令の日付

自 発

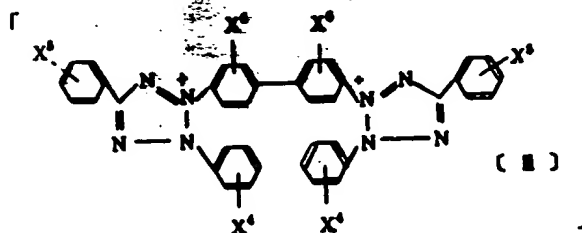
特許庁  
59.8.28

法である。」と補正する。

(6) 明細書21頁3行目に記載の「ゼラチンと有効成分として用いる」を「ゼラチンを用いる」と補正する。

(7) 明細書21頁18行目から同頁19行目にかけて記載の「ゼラチンを有効成分として用いて」を「ゼラチンを用いて」と補正する。

(8) 明細書24頁1行目から同頁5行目にかけて記載の一般式(II)を以下のとおり補正する。



(9) 明細書24頁6行目から同頁7行目にかけて記載の「(但し、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、-NO<sub>2</sub>又は-Hを表わし、X<sup>3</sup>は、-OCH<sub>3</sub>、-I又は-Hを表わす。)」を「(但し、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、-NO<sub>2</sub>又は-Hを表わし、X<sup>3</sup>は、-OCH<sub>3</sub>、-I又は-Hを表わす。)」と補正する。

5. 補正により減少する発明の数 1

6. 補正の対象

明細書中の発明の名称の欄、特許請求の範囲の欄及び発明の詳細な説明の欄。

7. 補正の内容

(1) 発明の名称の欄に記載の「シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法及び安定化用試薬」を「シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法」と補正する。

(2) 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。

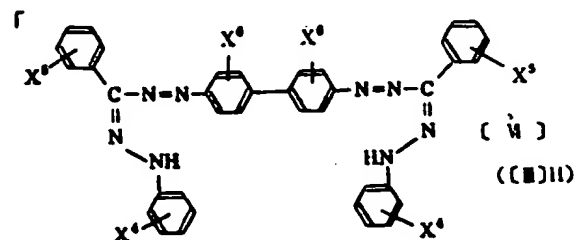
(3) 明細書19頁7行目に記載の「 $\alpha$ -シクロデキストリンを共存」を「 $\alpha$ -シクロデキストリンを夫々単独又は混合して共存」と補正する。

(4) 明細書19頁10行目から同頁11行目にかけて記載の「 $\beta$ -シクロデキストリン又は $\alpha$ -シクロデキストリン」を「 $\beta$ -シクロデキストリン又は $\alpha$ 及び $\alpha$ -シクロデキストリン」と補正する。

(5) 明細書19頁15行目から同頁16行目にかけて記載の「テトラゾリウム塩の安定化方法及び試薬である。」を「テトラゾリウム塩の安定化方

と補正する。

(10) 明細書27頁1行目から同頁5行目にかけて記載の一般式(III)を以下のとおり補正する。



(11) 明細書27頁6行目から同頁7行目にかけて記載の「(但し、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、-NO<sub>2</sub>又は-Hを表わし、X<sup>3</sup>は、-OCH<sub>3</sub>、-I又は-Hを表わす。)」を「(但し、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、-NO<sub>2</sub>又は-Hを表わし、X<sup>3</sup>は、-OCH<sub>3</sub>、-I又は-Hを表わす。)」と補正する。

(12) 明細書29頁10行目から同頁16行目にかけて記載の「好ましい一例としては、通常、」を「好ましくは、」と補正する。

(13) 明細書30頁1行目に記載の「本発明に於て

特に効果的なゼラチンは、」を「ナトラゾリウム塩から還元によって生成するホルマジン化合物の固定装置部材への染着を効果的に抑制するゼラチンは、」と修正する。

04明細書30頁5行目から同頁7行目にかけて記載の「しかしながら、本発明に係るゼラチンは、その平均分子量が」を「しかしながら、本発明で用いるゼラチンは、その平均分子量が」と修正する。

04明細書30頁14行目に記載の「通常、一例、0.1～0.7重量/容量多、」を「通常、0.1～0.7重量/容量多、」と修正する。

04明細書30頁14行目から同頁15行目にかけて記載の「好ましくは、一例、0.2～0.5重量/容量多」を「好ましくは、0.2～0.5重量/容量多」と修正する。

04明細書42頁9行目に記載の「実験法は実施例1に同じ。」の次に改行して以下の文句及び表を追加する。

「実施例4 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例1の発色試液の調製法に従い、

β-シクロデキストリンの代りに、γ-シクロデキストリンとα-シクロデキストリン1重量：1重量の混合物 0.2多を用いる。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1に同じ。

比較例3 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例4の発色試液からゼラチン、及びβ-シクロデキストリンとα-シクロデキストリンの混合物を除いた発色試液を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1に同じ。

実施例4と比較例3の測定結果比較表

比較表1

血清試料測定結果

血清No.	実施例4 (mg/dl)	比較例3 (mg/dl)
1	60.5	61.1
2	48.9	48.3
3	55.2	54.7
4	35.5	36.1
5	42.6	42.3
平均	48.54	48.50

比較表2

試料回収率の比較

	実施例4	比較例3
560nmの吸光度(水対照)	0.075	0.196

比較表3

コレステロール標準吸光度の比較

	実施例4	比較例3
560nmの吸光度(Std-S <sub>0</sub> )	1.263	1.277

比較表4

室温保存における発色試液の経時変化

	実施例4	比較例3
0時間	澄明	澄明
16時間	澄明	濁り及び少量の沈殿
48時間	澄明	濁り及び大量の沈殿
72時間	澄明	濁り及び大量の沈殿

比較表5

ガラスセルに対する染色性

	実施例4	比較例3
結果	染色無し	セル全体が淡紫色に染色

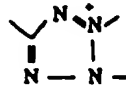
以上

## 別 紙

## 2. 特許請求の範囲

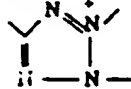
- (1)  $\beta$ -シクロデkastリン又は／及び $\gamma$ -シクロデkastリンを有効成分として用いる、

部分構造

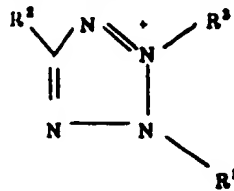


を有するテトラゾリウム塩の安定化方法。

- (2) 部分構造

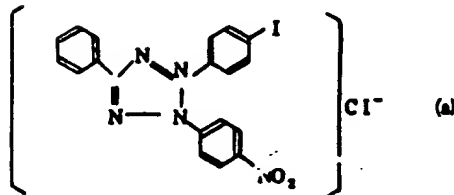


を有するテトラゾリウム塩が、一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩である、特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。

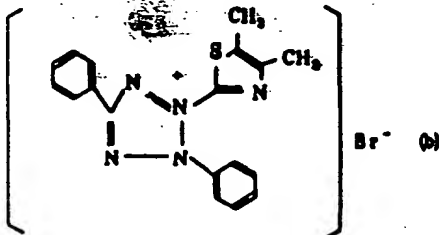


〔1〕

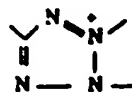
(但し、 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は有機残基を表わす。)



- (5) 一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩が、構造式(a)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第2項記載の安定化方法。

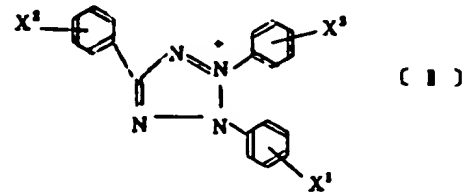


- (6) 部分構造



を有するテト

- (3) 一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩が、一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第2項記載の安定化方法。

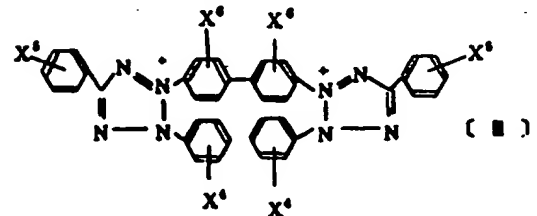


〔1〕

(但し、 $X^1$ 及び $X^2$ は、 $-\text{NO}_2$ 又は $-\text{H}$ を表わし、 $X^3$ は、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{I}$ 又は $-\text{H}$ を表わす。)

- (4) 一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩が構造式(a)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第3項記載の安定化方法。

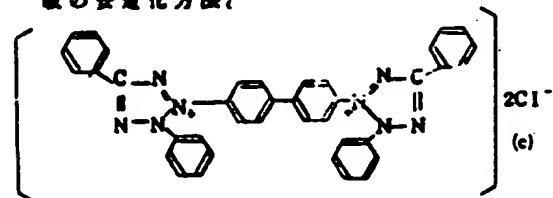
ラゾリウム塩が、一般式〔1〕で示されるジテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。



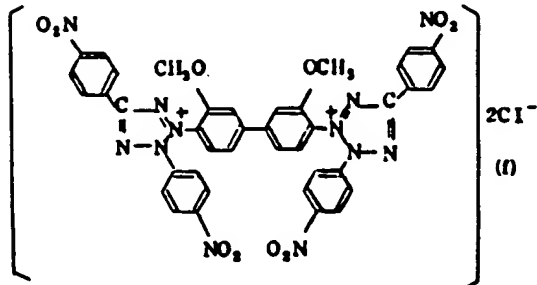
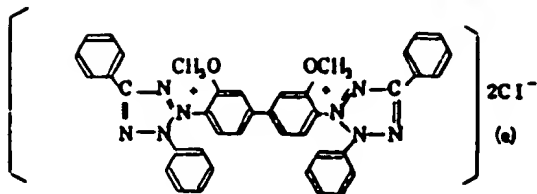
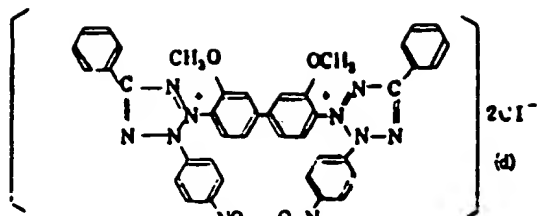
〔1〕

(但し、 $X^4$ 及び $X^5$ は、 $-\text{NO}_2$ 又は $-\text{H}$ を表わし、 $X^6$ は $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{I}$ 又は $-\text{H}$ を表わす。)

- (7) 一般式〔1〕で示されるジテトラゾリウム塩が、構造式(b)乃至(d)で示されるジテトラゾリウム塩の1である特許請求の範囲第6項記載の安定化方法。

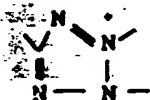


(c)



を有するテトラゾリウム塩及びβ-シクロデkastリン又はγ-シクロデkastリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液である、特許請求の範囲第8項、第9項、第10項又は第11項記載の安定化方法。

(4) テオール化合物及び部分構造



を有するテトラゾリウム塩及びβ-シクロデkastリン又はγ-シクロデkastリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液が、基質に作用してスーパーオキシドイオンを生成させる酸化酵素を含有する特許請求の範囲第12項記載の安定化方法。

(5) グルコース、コレステロール、グリセロール、グリセロール銅酸エステル、コリン、ア

(6) 溶液中にβ-シクロデkastリン又はγ-シクロデkastリンを存在させる、特許請求の範囲第1項、第2項、第3項、第4項、第5項、第6項、又は第7項記載の安定化方法。

(9) 溶液中のβ-シクロデkastリンの濃度が0.01~1.5重量/容量多である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(10) 溶液中のγ-シクロデkastリンの濃度が0.01~1.0重量/容量多である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(11) 溶液中のβ-シクロデkastリン及びγ-シクロデkastリンの濃度が、β-シクロデkastリン0.01~1.5重量/容量多、γ-シクロデkastリン0.01~1.0重量/容量多の範囲で任意の比率に混合した濃度である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(12) 溶液がテオール化合物及び部分構造

シルCoA、ビルビン酸、尿酸、キサンテン又は乳酸を基質とし、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール銅酸エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンテンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼである、特許請求の範囲第13項記載の安定化方法。

(13) テオール化合物が、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、メルカプトエタノール、チオサリチル酸、システアミン、システイン、ジメルカプトコハク酸である特許請求の範囲第12項又は第13項記載の安定化方法。

(14) 基質又は酸化酵素が被検試料中の基質又は酸化酵素である、特許請求の範囲第13項又は第14項記載の安定化方法。

(15) 基質又は酸化酵素が体液成分である、特許請求の範囲第15項記載の安定化方法。

以上



# 手続補正書

昭和59年 2月 28日

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

昭和58年特許願第95185号

## 2. 名称の名称

シクロデキストリンによるテトラ・ナリウム塩の安定化方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

特許番号 541

住所 大阪府大阪市東区通町3丁目10番地  
電話 TEL 03-270-0371

名 称 和光純薬工業株式会社

代 表 者 一 力 二 生

## 4. 補正の旨の日付

自 発

特許庁

## 5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄。

## 6. 補正の内容

(1)明細書31頁11行目に記載の「システム」又は「ジメルカプトコハク酸」を「システム、ジメルカプトコハク酸、又はコエンザイムA(CoA)」と補正する。

以上